Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

DER EINFLUSS VON 6-AMINONICOTINSÄUREAMID AUF DIE GLUCONEOGENESE UND AUF DAS HYPOPHYSEN-NEBENNIERENRINDEN-SYSTEM

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Dietrich von Herrath
aus Fribourg / Schweiz

1968

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552705_0044

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

DER EINFLUSS VON 6-AMINONICOTINSÄUREAMID AUF DIE GLUCONEOGENESE UND AUF DAS HYPOPHYSEN-NEBENNIERENRINDEN-SYSTEM

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Dietrich von Herrath
aus Fribourg / Schweiz

Dekan: Professor Dr. med. Hans Wolfgang S p i e r
Referent: Professor Dr. med. Hans H e r k e n
Korreferent: Professor Dr. med. Helmut C o p e r

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin.

Promotionsdatum: 27.6.1968

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	3
Methodik	5
I. Versuchstiere	5
II. Bestimmung des Glykogens in der Leber	5
III. Bestimmung der Glucose im Blut	6
IV. Bestimmung des Corticosterons im Blutserum	7
V. Bestimmung des Stickstoffs im Urin	8
VI. Statistische Auswertung	8
Ergebnisse	
I. Glykogengehalt der Leber	10
1. Intakte Tiere	
2. Epinephrektomierte Tiere	
3. Substituierte epinephrektomierte Tiere	
4. Hypophysektomierte Tiere	
II. Corticosteronkonzentration im Blutserum	18
III. Stickstoffausscheidung im Urin	20
IV. Blutzuckerkonzentration	23
Diskussion	26
Zusammenfassung	30
Literaturverzeichnis	32

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

EINLEITUNG

6-Aminonicotinsäureamid (6-AN), ein Antimetabolit des Nicotinsäureamids, führt bei Ratten in Dosen von 10 - 100 mg/kg zu charakteristischen neurotoxischen Symptomen (JOHNSON u. McCOLL 1955, 1956; COPER u. HERKEN 1963; BRUNNEMANN u. COPER 1963), Störungen im Mineralhaushalt (HERKEN et al. 1964, 1966) und in der Blutzuckerregulation (v. BRUCHHAUSEN 1965). Diese Wirkungen unterscheiden sich deutlich in ihrer Latenzzeit und Dauer.

Die ersten äußeren Zeichen der Vergiftung sind schlaffe Lähmungen, die ca. 4 Stunden nach der intraperitonealen Injektion von 25 mg/kg 6-AN an den hinteren Extremitäten beginnen und nach höheren Dosen schließlich die gesamte Skeletmuskulatur befallen. Überleben die Tiere das akute Stadium der Intoxikation, so entwickelt sich nach 3 - 4 Tagen eine Spastik, die meistens irreversibel ist. Die Paresen sind wie die ebenfalls nachweisbare Hypothermie (COPER, HADASS u. LISON 1966) und die nach 6-AN-Vorbehandlung verlängerte Hexobarbitalnarkose (v. HERRATH, COPER u. VEIT 1967) durch zentralnervöse Funktionsstörungen bedingt. (STERNBERG u. PHILIPS 1958, 1959; WOLF u. COWEN 1959; REDETZKI u. ALVAREZ-O'BOURKE 1962). Das EEG zeigt erniedrigte Frequenzen, Dysrhythmien und Spikes. (COPER, KUBICKI u. VEIT).

Außer der Einschränkung des tubulären Natrium- und Kaliumtransportes kommt es schon frühzeitig nach der 6-AN-Gabe zu intra- und extrazellulären Elektrolytverschiebungen in der Leber und in der Skeletmuskulatur. (HERKEN, SENFT u. ZEMISCH 1964, 1966; ZEMISCH 1964).

V. BRUCHHAUSEN (1965) fand eine Hyperglykämie, die ca. 20 Stunden lang anhält und die durch gesteigerte Inkretion von Adrenalin und durch einen Wirkungsverlust des Insulins hervorgerufen wird. (SCHACHT, SCHULTZ, SENFT 1965; SCHULTZ, SENFT, LOSERT u. SCHACHT 1965; SCHACHT 1965; v. BRUCHHAUSEN u. HERKEN 1966).

Der Wirkungsmechanismus des Antimetaboliten ist noch nicht völlig geklärt. Wahrscheinlich aber beruht ein Teil

der Wirkungen auf der Biosynthese des 6-AN-Analogen des NAD(P). (DIETRICH et al. 1958). Die NAD(P)-Nucleosidase (NAD(P)-Glycohydrolase EC 3.2.2.6.) tauscht das Nicotinsäureamid der beiden Coenzyme gegen das applizierte 6-AN aus, da sie nicht streng substratspezifisch ist. So entstehen in vivo unphysiologische Pyridinnucleotide (6-ANAD(P)), die im Gehirn, im Skeletmuskel, in der Leber und Niere nachgewiesen und auch in vitro mit Hilfe des angereicherten Enzyms rein gewonnen wurden. (HERKEN u. NEUHOFF 1964; BRUNNEMANN, COPER u. NEUBERT 1964). Im Gegensatz zum NAD(P) sind die 6-AN-Analogen am C_4 des Pyridinringes nicht hydrierbar. Sie können daher nicht als Cofaktoren wasserstoffübertragender Enzyme dienen. Die NAD(P)-Konzentration in der Zelle wird durch die Synthese des 6-ANAD(P) nicht wesentlich vermindert, vielmehr steigt der Nucleotidgehalt um den Betrag des neugebildeten Analogen an. (COPER, HADASS u. LISON 1966). Die toxischen Wirkungen des 6-AN können daher nicht durch einen absoluten Mangel an NAD(P) und dadurch gehemmte Enzymreaktionen erklärt werden. COPER u. NEUBERT (1964; NEUBERT u. COPER 1965) ersetzten bei kinetischen Messungen des "malic enzyme", der Glucose-6-Phosphat- und Isocitrat-Dehydrogenase das NADP teilweise durch das nicht reduzierbare Analoge. Dadurch fiel die Aktivität dieser Oxydoreduktasen stärker ab, als es der restlichen Menge des Coenzymes entsprach. 6-ANADP erwies sich als kompetitiver Hemmstoff dieser Reaktionen im Hinblick auf das als Substrat betrachtete NADP. Es entsteht somit ein relativer Mangel an NADP durch Konkurrenz des Analogen mit dem natürlichen Cofaktor um den Rezeptor des Enzymproteins.

Ausgehend von den Befunden, daß 6-ANAD(P) enzymatische Reaktionen des Kohlehydratstoffwechsels hemmen kann und über eine verstärkte Freisetzung von Adrenalin eine Hyperglycämie bewirkt, wird in der vorliegenden Arbeit der Einfluß des 6-AN auf den Glykogengehalt der Leber und auf das Hypophysen-Nebennierenrinden-System untersucht.

METHODEN

I. Versuchstiere

Weiblichen, 180 - 240 g schweren Albinoratten, die mit Altromin der Fa. Altrogge und Leitungswasser ernährt waren, wurden zwischen 5 und 50 mg/kg 6-AN in 0,9 %iger NaCl-Lösung i.p. injiziert. Die Kontrolltiere erhielten nur gleiche Volumina (10 ml/kg) des Lösungsmittels. Da die Ratten nach Gabe von 6-AN kaum noch fressen, wurde beiden Gruppen nach der Injektion die Nahrung entzogen, um gleiche Versuchsbedingungen zu schaffen. Das Trinkwasser verblieb ad libitum. Die Tiere wurden morgens stets zur gleichen Zeit ohne größere Irritation dekapitiert.

Epinephrektomie: In Äthernarkose wurden die Nebennieren nach Paravertebralschnitten aufgesucht und mit gebogenen Pinzetten entfernt. Der Blutverlust war gering. 2 Stunden nach der Operation erhielten die Tiere 3 ml 0,9 %ige NaCl-Lösung durch eine Magensonde. Bis zur 6-AN-Gabe nach weiteren 14 Stunden wurde Altromin und NaCl-Lösung ad libitum gegeben; danach nur die Kochsalzlösung zur Substitution.

Hypophysektomie: Nachdem die Schädelbasis auf dem parapharyngealen Zugangsweg freigelegt und durchbohrt war, wurde die Hypophyse unter mikroskopischer Kontrolle mit einer Glaskapillare abgesaugt. (SMITH 1930). Die Tiere kamen 24 Std. später in den Versuch. Bis dahin bestand die Nahrung aus Altromin, Pansenstückchen, 5 %iger Glucose- und 0,9 %iger NaCl-Lösung.

II. Bestimmung des Glykogens in der Leber

Das Glykogen wurde nach GOOD, KRAMER u. SOMOGYI (1933) gewonnen. Ca. 1 g Lebergewebe ausgebluteter Tiere wird durch Erhitzen in 2 ml 30 %iger KOH hydrolytisch aufgeschlossen. Durch Zugabe 2,5 ml abs. Alkohols fällt das Glykogen aus. Das Glykogen wird abzentrifugiert, einmal in 2,5 ml Äthanol gewaschen und im Wasserbad mit 2,5 ml 1n H_2SO_4 2 Std. lang hydrolysiert. Mit NaOH wird anschließend neu-

tralisiert und mit H_2O auf 50 ml verdünnt. 1 ml dieser Lösung kommt in den Reagenzansatz.

Die entstandene Glykogenglucose wurde nach NELSON (1944) und SOMOGYI (1945; 1952) bestimmt. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf einer Redoxreaktion, die mit der Entstehung eines blauen Molybdänfarbstoffes gekoppelt ist. Dazu benötigt man zwei Reagenzlösungen folgender Zusammensetzung:

1. Kupferreagenz nach SOMOGYI (1945)

28 g	$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$
100 ml	1n NaOH
40 g	KNa-Tartrat
8 g	$CuSO_4$
180 g	Na_2SO_4
	H_2O ad 1 000 ml

2. Arsenmolybdatreagenz nach NELSON (1944)

25 g	$(NH_4)_2MoO_4$ in 450 ml H_2O gelöst
21 ml	konz. H_2SO_4
3 g	$Na_2HAsO_4 \cdot 7\ H_2O$ in 25 ml H_2O gelöst
	H_2O ad 1 000 ml

Glucose reduziert das 2-wertige Kupfer, das im zugesetzten SOMOGYI-Reagenz (1 ml) in Form des blauen Kupfer-Tartrat-Komplexes vorliegt, zu gelbem CuOH und rotem Cu_2O. Der Gehalt an Na_2SO_4 verhindert die Reoxydation des Kupfers durch den Luftsauerstoff. Durch 20 min. langes Erhitzen im Wasserbad läuft die Reaktion schneller und quantitativ ab. Gibt man 1 ml des NELSON-Reagenzes hinzu, entsteht ein stabiler, tiefblauer Farbstoff, dessen optische Dichte bei 660 nm der zugesetzten Menge des Reduktionsmittels linear äquivalent ist. Um nicht zu hohe Extinktionswerte zu bekommen, wurde die Farbstofflösung auf 25 ml mit H_2O verdünnt. Zur Colorimetrie diente das BECKMANN-Spektrophotometer DU. Das Glykogen ist als mg Glucose pro 1 g Leber (Frischgewicht) angegeben.

III. Bestimmung der Glucose im Blut

Der Blutzucker wurde mit der Testkombination der Fa.

Boehringer & Söhne (Mannheim) nach Angaben von HUGGETT u. NIXON (1957) bestimmt.

Glucoseoxydase oxydiert Glucose in wässriger Lösung (Phosphatpuffer pH 7) und in Anwesenheit von O_2 über Gluconolakton zu Gluconsäure und H_2O_2. Die Oxydationskraft des entstehenden Wasserstoffperoxydes wird zu einer gekoppelten Indikatorreaktion genutzt. Dabei geht der Wasserstoffdonator o-Dianisidin unter enzymatischer Katalyse der zugesetzten Peroxydase in einen rotbraunen Farbstoff über, der bei 436 nm photometriert wird. Die Substrat- und Enzymkonzentrationen sind so bemessen, daß die Reaktionen quantitativ ablaufen. Die Extinktion der Farbstofflösung ist daher ein Maß für die umgesetzte Glucose.

IV. Bestimmung des Corticosterons im Blutserum

Das Blut wurde bei der Dekapitation in heparinisierten Gläsern aufgefangen und das Serum durch anschließendes Zentrifugieren abgetrennt. Die Bestimmung des Corticosterons erfolgte nach ZENKER u. BERNSTEIN (1958). Diese Methode vereinigt die Technik der doppelten Extraktion von SILBER und PORTER (1954) mit der H_2SO_4- induzierbaren Fluoreszenz der Serumcorticosteroide (SWEAT 1954).

1. Extraktion:

Das Corticosteron wird durch kräftiges Schütteln (15 sec) des Blutserums mit Chloroform (Verhältnis 1:50) extrahiert. Nach dem Zentrifugieren (5 Min.; 2 500 U/Min.) wird die überstehende wässrige Phase mit einer Glaskapillare abgesaugt und verworfen, der Chloroformextrakt mit 0,1 n NaOH (Verhältnis 10:1) gewaschen. Die Trennung der Phasen erfolgt wiederum durch Zentrifugieren und Absaugen.

2. Extraktion:

Durch Schütteln (15 sec) des Chloroformextraktes mit 3 ml des Fluoreszenzreagenzes, das konz. H_2SO_4 und 50 %igen Äthylalkohol im Verhältnis 2,4 : 1 enthält, geht das Corticosteron wieder in die wässrige Phase. Zwei Stunden nach der Extraktion mit dem Reagenz hat sich die Fluoreszenz voll entwickelt und wird zu diesem Zeitpunkt gemessen.

Dieses Verfahren erfaßt durch das günstige Mischungsverhältnis von H_2SO_4 und Äthanol im Fluoreszenzreagenz vorwiegend Corticosteron. Andere fluoreszierende Steroide des Rattenserums, wie Cortisol und Östradiol, gehen nur zu 5 % in die Messwerte ein wegen der niedrigeren Konzentrationen und wegen der geringen relativen Fluoreszenz (19,8 bzw. 14,2 % des Corticosterons). Mit dem Spektralfluorophotometer AMINCO-BOWMAN wurden bei der optimalen Emission von 540 nm Anregungsspektren mit dem Maximum bei 470 nm (unkorrigierte Wellenlängen) geschrieben.

V. Bestimmung des Stickstoffs im Urin

Die Ratten dieses Versuches hatten ein Gewicht von 267 ± 12 g. Sie wurden in Stoffwechselkäfigen gehalten, der Urin nach 6, 12, 24, 36, 48 Stunden gesammelt. Eine Gruppe erhielt 10 mg/kg 6-AN in physiologischer Kochsalzlösung, die andere nur das Lösungsmittel (10 ml/kg). Zu Beginn wurden jedem Tier 6 ml, nach 6, 12, 24, 36 Stunden jeweils 10 ml H_2O durch eine Magensonde infundiert.

Der Aminostickstoff wurde nach KJELDAHL (1883) mit Hilfe der Destillationsapparatur der Fa. BÜCHI (Schweiz), eines weiterentwickelten Gerätes von PARNAS u. WAGNER (1938), bestimmt. Die Stickstoffausscheidung im Urin ist auf das Körpergewicht bezogen (mg N/100 g). Der durch das applizierte 6-AN zugeführte Stickstoff wurde nicht berücksichtigt. Denn selbst unter der Voraussetzung, daß die Substanz in den ersten 12 Stunden vollständig eliminiert würde (nach COPER, HADASS u. LISON 1966 ca. 40 %), betrüge der Fehler nur 0,4 %.

VI. Statistische Auswertung

Die Meßwerte der Versuchsreihen sind als $\bar{x} \pm \sigma$ angegeben. Die Versuchsanordnungen erlaubten eine Prüfung der Ergebnisse im zweiseitigen Signifikanztest nach STUDENT (t-Test). Die Wahrscheinlichkeit, daß die Differenz der Mittelwerte Null ergibt (Nullhypothese), beträgt $p = 2\alpha$.

Die standardisierte Veränderliche t wurde nach der Formel

$$t = \sqrt{\frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)^2 \cdot n_1 \cdot n_2}{\sigma_1^2 \cdot n_2 + \sigma_2^2 \cdot n_1}}$$

errechnet.

$\bar{x}$ = Mittelwert
σ = Standardabweichung
n = Zahl der Stichproben

Die zu t gehörige Wahrscheinlichkeit für das Zutreffen der Nullhypothese wurde unter dem Freiheitsgrad $\varphi = n_1 + n_2 - 2$ der Signifikanzschrankentabelle nach STUDENT (DOKUMENTA GEIGY) entnommen. In dieser Arbeit werden Unterschiede in den Meßwerten zweier Versuchsreihen als statistisch gesichert angesehen, wenn $p < 0{,}0027$ ist.

ERGEBNISSE

I. Der Glykogengehalt der Leber

1. Intakte Tiere

Der Glykogengehalt der normalen Rattenleber unterliegt tages- und jahreszeitlichen Schwankungen. Er ist morgens mit 45 mg/kg Leber (Frischgewicht) besonders hoch, da die Tiere gewöhnlich nachts den größten Teil ihrer Nahrung aufnehmen. Diese rasch verfügbare Kohlehydratreserve, die im Vergleich zum Glucosebedarf des Organismus kalorisch gering ist, wird innerhalb der ersten 12 Stunden Hunger verbraucht und beträgt dann nur noch 7 % (3,2 mg/g) des Ausgangswertes. Danach nimmt das Glykogen, im Gegensatz zu dem von ITO (1962) beschriebenen Wiederanstieg, kontinuierlich bis zu 0,3 mg/g nach 72 Stunden Hunger ab.

Injiziert man Ratten bei gleichzeitigem Nahrungsentzug einmalig 10 mg/kg 6-AN, so sinkt der Glykogengehalt zunächst wie bei den Kontrolltieren ab, steigt aber nach einer Latenzzeit von 24 Stunden wieder deutlich an. Nach 48 Std. wird mit 18,7 mg/g (40 % des Ausgangswertes) das Maximum erreicht. Zu diesem Zeitpunkt enthält die Leber 6-AN-vergifteter Tiere ca. 20mal mehr Glykogen als die der unbehandelten. Danach fallen die Werte wieder ab, sind aber noch nach 72 Std. langem Hunger statistisch gesichert erhöht. (Abb. 1).

Derselbe Effekt läßt sich an Ratten nachweisen, die vor der Applikation des Nicotinamidantagonisten bereits einen Tag hungerten und deren Glykogen dadurch verläßlich abgesunken war. Nach weiteren 24 Std. ist es wieder auf 22,4 mg/g angestiegen.

Höhere Dosen des Antimetaboliten (25 - 50 mg/kg) verkürzen die Latenzzeit um etwa 12 Std., haben aber keinen Einfluß auf die Höhe und den Zeitpunkt des maximalen Glykogengehaltes. (Tab. 1). Es liegt somit keine deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung vor. Die Schwelle für das Auftreten der beschriebenen Wirkung wurde bei ca. 5 mg/kg ermittelt.

Noch eine Woche nach der letzten Injektion von 10 mg/kg 6-AN sind die Glykogenwerte trotz des 48 Std. langen Hun-

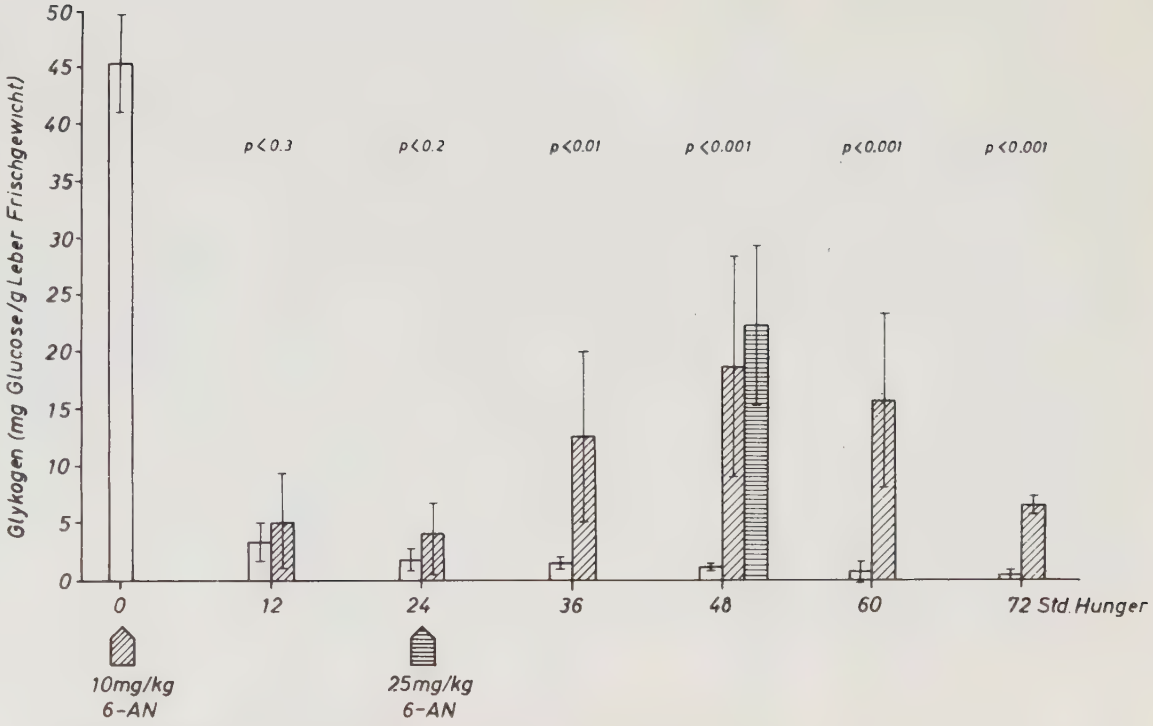

Abb. 1. Zeitlicher Verlauf des Glykogengehaltes der Leber.

□ = hungernde Tiere ▨ = hungernde Tiere + 10mg/kg 6-AN ▤ = 25mg/kg 6-AN nach 24 Std. Hunger

Tabelle 1. Glykogengehalt der Leber während des Hungers (mg Glucose/g Leber Frischgewicht)

Hunger in Std.	0	12	24	36	48	60	72
Kontrolltiere	45,38 ± 4,39 n=10	3,19 ± 1,63 n=5	1,62 ± 1,19 n=9	1,32 ± 0,50 n=5	1,03 ± 0,38 n=9	0,54 ± 0,70 n=5	0,29 ± 0,26 n=7
10mg/kg 6-AN		5,09 ± 4,05 n=5	3,97 ± 3,20 n=5	12,57 ± 7,31 n=5	18,72 ± 9,87 n=13	15,67 ± 8,49 n=5	6,41 ± 0,75 n=5
25mg/kg 6-AN		5,45 ± 3,48 n=5	11,74 ± 5,21 n=5	16,90 ± 6,80 n=5	13,19 ± 6,88 n=5	16,70 ± 5,66 n=5	10,93 ± 5,36 n=5
50mg/kg 6-AN		1,79 ± 1,54 n=7	9,87 ± 3,74 n=7	10,87 ± 2,53 n=6	16,77 ± 3,99 n=7	exitus	
Dreimal 10mg/kg 6-AN im Abstand von je 1 Woche; nach der letzten Gabe 48 Std. Hunger					18,25 ± 3,86 n=5		
Zweimal 10mg/kg 6-AN im Abstand von 1 Woche; 1 Woche nach der letzten Gabe 48 Std. Hunger					5,30 ± 2,47 n=5		

gers gering erhöht. (Tab. 1). Es ist unwahrscheinlich, daß diese Störung durch die lange Verweildauer eines Teiles der unveränderten Substanz hervorgerufen wird. COPER et al. (1966) wiesen in Bilanzversuchen an Ratten nach, daß etwa 40 % einer einmalig gegebenen Dosis von 10 mg/kg 6-AN innerhalb der ersten 12 Std. im Urin ausgeschieden werden. Wenn auch C^{14}-markiertes 6-AN noch nach 8 Tagen im Organismus nachzuweisen ist und 6-ANAD(P) 96 Std. p.i. aus der Leber isoliert werden konnte, so erscheinen die Konzentrationen ($3{,}4 \cdot 10^{-8}$ Mol/g) für den relativ spät einsetzenden Effekt doch zu gering.

Im Einklang damit steht auch der Befund, daß die glykogenspeichernde Wirkung nach 3 Injektionen von 10 mg/kg 6-AN im Abstand von je einer Woche die nach einmaliger Gabe von 10 mg/kg nicht übertrifft. (Tab. 1).

2. Epinephrektomierte Tiere

Wegen der begrenzten Fähigkeit des Organismus, Kohlehydrate zu speichern, ist besonders während des Hungers die Gluconeogenese ein wichtiger Prozeß. Durch oxydative Desaminierung und Transaminierung glucoplastischer Aminosäuren können Vorstufen der Glucose aus kohlenhydratfreien Verbindungen aufgebaut werden. Ist die periphere Glucoseaufnahme gehemmt oder übersteigt die endogene Glucosebildung den Kohlehydratbedarf, synthetisiert die Leber in verstärktem Maße Glykogen. Dieser Vorgang kann durch die Inkretion von Glucocorticoiden, bei der Ratte vorwiegend von Corticosteron, gefördert werden und ist andererseits bei Abwesenheit dieser Hormone stark verlangsamt. (KENDALL 1948; WELT, DE WITT, INGLE u. MORLEY 1952; ALTZULER, STEELE, WALL u. DE BODO 1957, 1958).

Deshalb wurde an epinephrektomierten Tieren der Leberglykogengehalt ohne und nach Applikation von 6-AN untersucht. Die Tab. 2 zeigt, übereinstimmend mit Befunden von LONG, KATZIN u. FRY (1940), daß das Glykogen ohne den Antimetaboliten nach 48 Std. Hunger noch stärker abgesunken ist als bei intakten Ratten. Nach Injektion von 6-AN (10 mg/kg) steigt es bei diesen Tieren auch nicht

Tabelle 2. Leberglykogen- und Blutzuckerwerte
nach 48 Std. Hunger bzw. 48 Std. Hunger + 10 mg/kg 6-AN

	Normale Tiere		Epinephrektomierte Tiere		Hypophysektomierte Tiere	
	48 Std. Hunger	48 Std. Hunger 10mg/kg 6-AN	48 Std. Hunger	48 Std. Hunger 10mg/kg 6-AN	48 Std. Hunger	48 Std. Hunger 10mg/kg 6-AN
Leberglykogen in mg/g Leber Frischgewicht	1,03 ± 0,38	18,72 ± 9,87	0,32 ± 0,08	0,37 ± 0,10	0,32 ± 0,12	0,35 ± 0,10
	n = 9	p < 0,001 n = 13	n = 9	p < 0,2 n = 19	n = 11	p < 0,6 n = 10
Blutzucker in mg/100ml Plasma	67,6 ± 8,2	96,7 ± 12,7	24,3 ± 1,8	32,4 ± 12,0	47,6 ± 4,5	45,9 ± 4,7
	n = 17	p < 0,0005 n = 10	n = 5	p < 0,02 n = 10	n = 11	p < 0,5 n = 10

Tabelle 3. Glykogen- und Blutzuckerwerte epinephrektomierter Tiere nach 48 Std. Hunger. Während dieser Zeit Substitution mit Cortisol.

Cortisol	Glykogen mg/g	Blutzucker mg/100 ml
0,1mg/kg pro Tag	0,2 ± 0,1 n=6	36,9 ± 4,3 n=6
	p > 0.05	p < 0.001
0,1mg/kg pro Tag 10mg/kg 6-AN	0,5 ± 0,3 n=5	65,7 ± 12,6 n=5
1mg/kg pro Tag	0,6 ± 0,3 n=5	55,1 ± 4,5 n=5
	p > 0.05	p < 0.001
1mg/kg pro Tag 10mg/kg 6-AN	1,1 ± 0,6 n=7	70,9 ± 5,6 n=7
10mg/kg pro Tag	17,3 ± 4,1 n=5	59,4 ± 9,3 n=5
	p > 0.6	p < 0.005
10mg/kg pro Tag 10mg/kg 6-AN	18,9 ± 6,1 n=5	111,0 ± 21,4 n=5

wieder an. Es lag nahe zu prüfen, ob unter Substitution mit NNR-Hormonen der glykogenspeichernde Effekt der Substanz wieder auftritt.

3. Substituierte, epinephrektomierte Tiere

Epinephrektomierten Ratten wurde während des Hungers Cortisol in steigenden Mengen subcutan injiziert. Durch geringe Corticoidgaben (0,1 - 1,0 mg/kg pro Tag) werden die Glykogenwerte nicht verändert; sie bleiben wie bei den nebennierenlosen Kontrolltieren niedrig. Nach 10 mg/kg pro Tag dagegen ist die Leber mit 17,3 mg/g im Hinblick auf den Glucosemangel im strengen Hunger relativ glykogenreich. Das entspricht etwa der Wirkung von 10 mg/kg 6-AN an nicht operierten Tieren unter sonst gleichen Versuchsbedingungen. Zusätzliches 6-AN bleibt auch hier, unabhängig von der Höhe der Substitution, ohne additiven Einfluß. (Tab. 3). Damit ist gezeigt, daß die Substanz wohl mehr über als wie die NNR-Hormone wirkt. Es mußte also möglich sein, durch Ausschalten der Hypophyse die Erhöhung des Leberglykogengehaltes nach 6-AN zu verhindern.

4. Hypophysektomierte Tiere

Die äußeren Vergiftungssymptome sind an normalen, epinephrektomierten und an hypophysektomierten Tieren völlig gleichartig. Dennoch bleibt auch bei diesen die glykogenspeichernde Wirkung des 6-AN aus. (Tab. 2). Sie ist auch nicht durch zusätzliche Substitution mit ACTH (1 - 50 mE/100 g) zu erreichen, obwohl nach SYNDOR und SAYERS (1954) etwa 2 - 3 mE ACTH/100 ml Blut ausreichen, die Nebennierenrinde der Ratte maximal zu stimulieren. Wahrscheinlich fehlt diese Wirkung wegen der kurzen Halbwertszeit einmaliger oder in Intervallen gegebener ACTH-Dosen (RETIENE et al. 1963) und wegen des relativ hohen Glucosebedarfs im Hunger. Eine nicht maximal gesteigerte Gluconeogenese könnte unter diesen Bedingungen nicht als Glykogen faßbar werden.

Der nach 6-AN gefundene Wiederanstieg des Leberglykogens trotz fehlender Nahrungszufuhr könnte auf einer gesteigerten

Tabelle 4. Corticosteronkonzentration im peripheren Blutserum. (µg/100 ml Serum)

Hunger in Std.	Corticosteron	
	im Hunger	im Hunger +10 mg/kg 6-AN
0	11,21 ± 5,0 n = 15	
6	13,26 ± 3,7 n = 11	37,23 ± 8,6 n = 11
	p < 0.0005	
12	16,79 ± 8,2 n = 11	50,36 ± 10,1 n = 11
	p < 0.0005	
24	25,76 ± 13,7 n = 16	41,50 ± 8,7 n = 18
	p < 0.001	
36	22,75 ± 10,2 n = 13	36,79 ± 15,7 n = 12
	p > 0.01	
48	27,38 ± 12,3 n = 17	34,52 ± 10,5 n = 17
	p > 0.05	
24; 10 mg/kg 6-AN weitere 24 Std. Hunger		42,73 ± 4,9 n = 10
24 Hypophysekt. Tiere	1,75 ± 1,4 n = 9	0,78 ± 1,3 n = 10
	p > 0.6	

Neusynthese des Glykogens oder einer gehemmten phosphorolytischen Spaltung oder auf einer Kombination beider Vorgänge beruhen. Gegen den direkten Eingriff in diese enzymatischen Reaktionen spricht die Beobachtung , daß 6-AN nur am normalen Tier glykogenspeichernd wirkt. Nach Entfernung der Nebennieren und der Hypophyse verliert der Antimetabolit diese Wirkung, selbst unter Substitution mit Cortisol bzw. ACTH in physiologischen Dosen. Die Einlagerung des Glykogens setzt also nicht nur die Anwesenheit, sondern auch den intakten Regulationsmechanismus der Nebennierenrindenhormone voraus. Diese Befunde stützen die Annahme, daß 6-AN über eine gesteigerte Ausschüttung von Glucocorticoiden die Gluconeogenese verstärkt und dadurch den Glykogengehalt der Leber erhöht.

II. Corticosteronkonzentration im Blutserum

Wenn 6-AN die Corticosteronproduktion und -inkretion stimuliert, so müßte dies an der Konzentration im Blutserum zu erkennen sein. Dieser Parameter scheint mehr über den jeweiligen Funktionszustand der NNR auszusagen als der Corticosterongehalt der Nebennieren selbst, der 6 Std. nach 50 mg/kg 6-AN i.p. nicht erhöht ist. (SCHULTZ, SENFT, LOSERT u. SCHACHT 1966). So ist z.B. auch nach Epinephfektomie das ACTH im Blut vermehrt, in der Hypophyse aber unverändert. (SYNDOR u. SAYERS 1954).

Schon allein als Ausdruck der allgemeinen Stress-Situation während des Hungers steigt der Corticosterongehalt im Serum von der 6. bis 24. Std. langsam auf mehr als das Doppelte des Normalwertes an. (Tab. 4). Diese Konzentration wird mindestens bis Ende des zweiten Tages aufrechterhalten, ohne daß dadurch das Glykogen in der Leber angereichert würde. Die Stimulierung ist für eine solche Wirkung wahrscheinlich nicht ausreichend.

6-AN-vergiftete Tiere reagieren schon innerhalb der ersten 6 Std. mit einer sehr viel stärkeren Ausschüttung. Die Corticosteronkonzentration ist nach 6 und 12 Std. dreimal so hoch wie bei den Kontrollen. Auch wenn das gluconeogenetisch

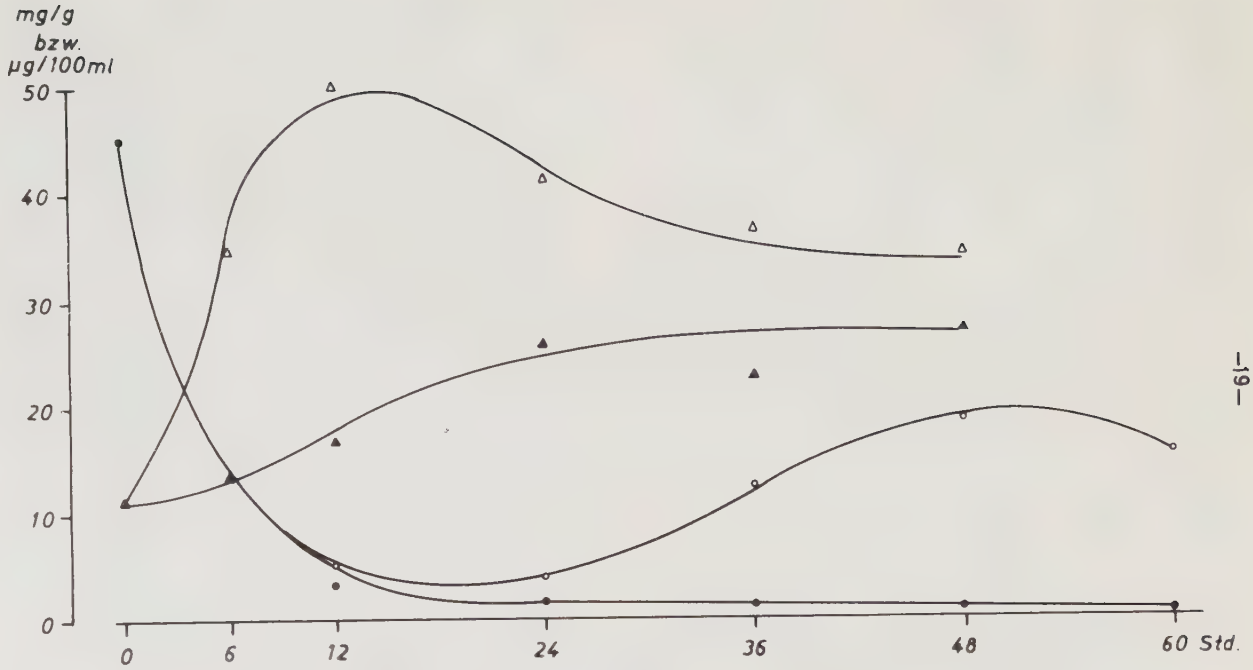

Abb. 2. Leberglykogen und Serumcorticosteron während des Hungers.

Glykogen (mg/g): ●—● Hunger ○—○ Hunger + 10 mg/kg 6-AN

Corticosteron (µg/100ml): ▲—▲ Hunger △—△ Hunger + 10 mg/kg 6-AN

wirksame Hormon danach allmählich abnimmt, bleibt es doch bis zum Ende des ersten Tages erhöht.($p < 0{,}001$). Tiere, die schon vor Versuchsbeginn 24 Std. hungerten, verhalten sich völlig gleichartig.

Die relativ lang anhaltende Steigerung der Corticosteronkonzentration (Halbwertszeit beim Menschen etwa 1 - 2 Std.; MIGEON et al. 1956; PETERSON 1957, 1960) kommt sicherlich über den ACTH-Mechanismus zustande, denn 6-AN setzt am hypophysektomierten Tier kein Corticoid frei. (Tab. 4). Der Angriffspunkt des Antimetaboliten bzw. seines Analogen kann also nicht die Nebennierenrinde sein, sondern muß in der Hypophyse oder im Hypothalamus angenommen werden.

In Abb. 2 ist der zeitliche Verlauf des Corticosteronanstieges mit dem des Glykogengehaltes der Leber korreliert: die Verdoppelung der normalen Hormonkonzentration, wie sie im Hunger auftritt, wirkt sich nicht glykogenspeichernd aus. Dagegen erhöht die starke Corticosteroninkretion nach 6-AN (das Fünffache des Normalwertes) den Glykogengehalt nach einem Zeitraum von 24 - 36 Std. beträchtlich.

III. Stickstoffausscheidung im Urin

Als Zeichen des durch Glucocorticoide geförderten Proteinabbaus werden mehr Harnstoff und andere N-haltige Substanzen im Urin eliminiert. (FOURMAN 1950; LONG, FRY u. BONNCASTLE 1960). Es wurde deshalb untersucht, ob der nach 6-AN gemessene Anstieg des Serumcorticosterons für diesen Effekt ausreicht und damit die Annahme stützt, daß die Speicherung des Leberglykogens auf einer gesteigerten Gluconeogenese beruht.

Wie Abb. 3 zeigt, verläuft die Stickstoffausscheidung hungernder Ratten während des 48-stündigen Versuches linear mit der Zeit. Unter 6-AN wird sie ab der 12. Std. deutlich höher und steigt bis zur 48. Std. auch noch steiler an. Am Ende des zweiten Tages haben die vergifteten Tiere 34 mg N/ 100 g = 37 % mehr eliminiert. Auch das Körpergewicht ist auf 83 % gegenüber 87 % stärker zurückgegangen.(Abb. 5). Die Gewichtsabnahme kann aber nicht durch eine vermehrte Wasserausscheidung erklärt werden, denn die gestörte Wasserbilanz

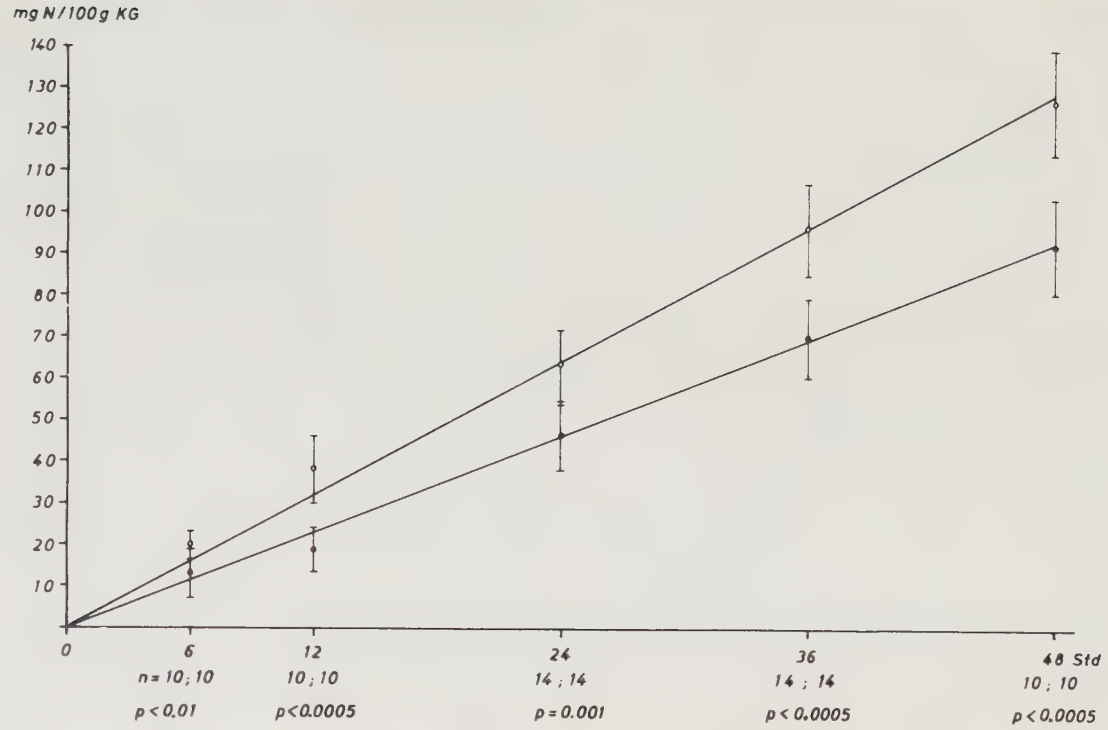

Abb. 3. Stickstoffausscheidung im Urin. (mg N/100g Körpergewicht)

hungernde Tiere — hungernde Tiere + 10mg/kg 6-AN

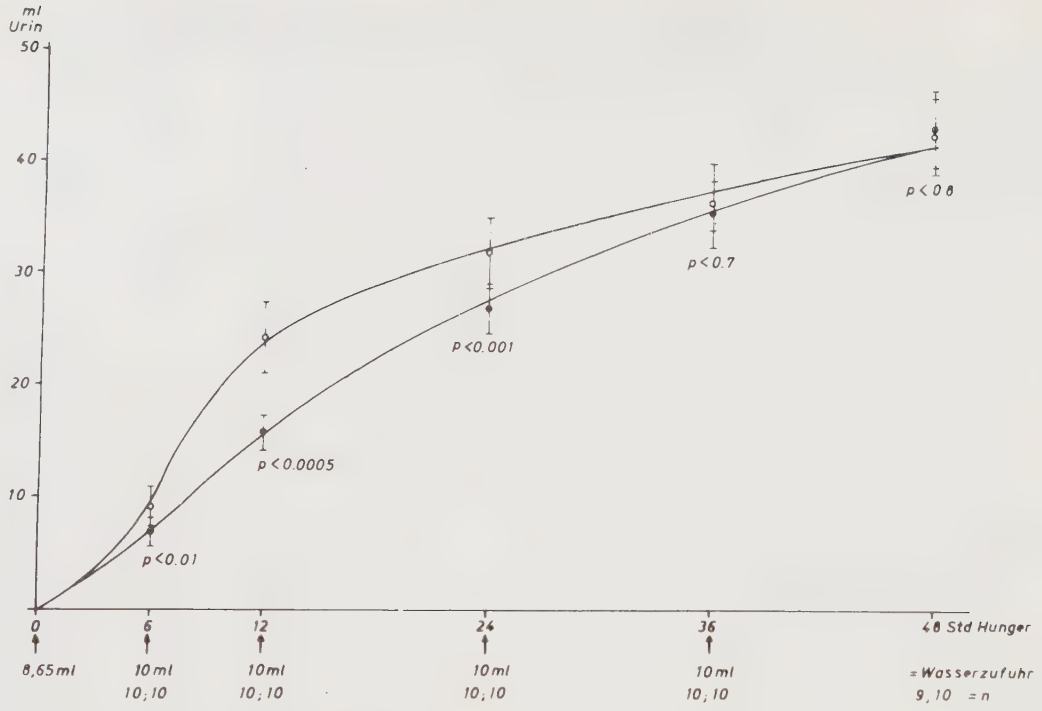

Abb. 4. Urinausscheidung während des Hungers.

●——● *hungernde Tiere* ○——○ *hungernde Tiere + 10 mg/kg 6-AN*

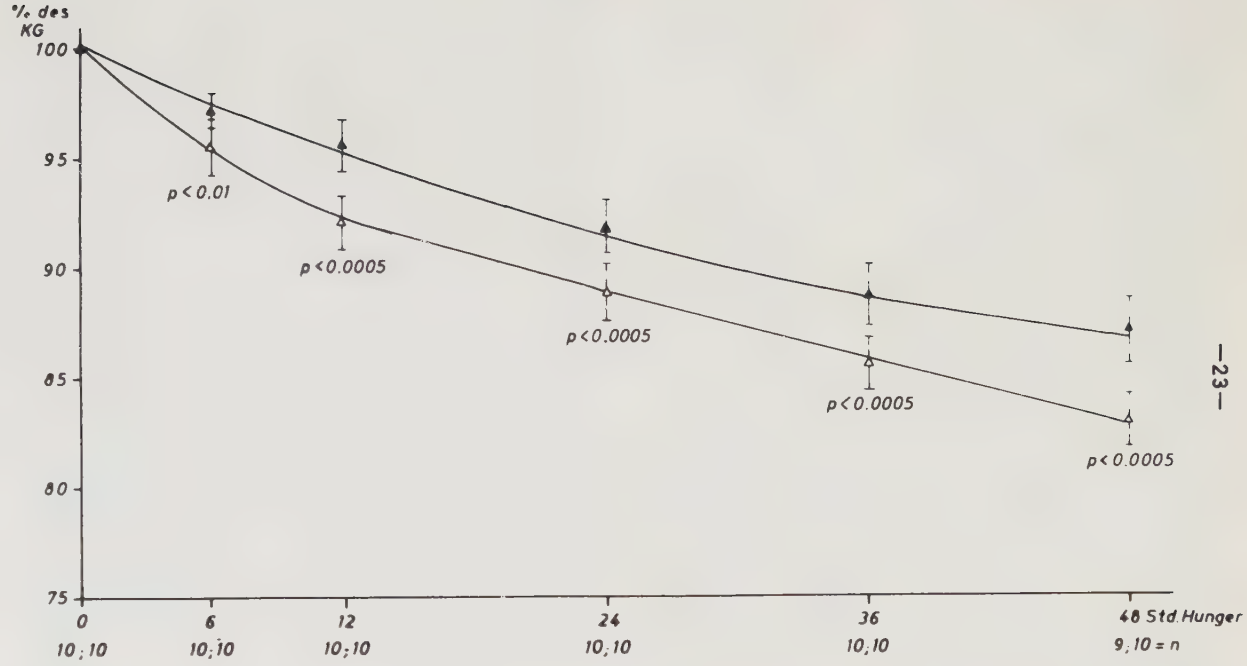

Abb. 5: Gewichtsabnahme während des Hungers.

▲——▲ hungernde Tiere △——△ hungernde Tiere + 10 mg/kg 6-AN

hat sich bis dahin wieder normalisiert. Der diuretische Effekt des 6-AN wird schon innerhalb der ersten 6 Std. sichtbar, besonders, wenn die Tiere nur gerade soviel Flüssigkeit erhalten, wie es ihrem täglichen Bedarf entspricht. Nach 12 Std., zur Zeit der größten Diurese, haben sie 29 % mehr Wasser eliminiert als zugeführt wurde. Danach wird ein Teil des infundierten Wassers wieder retiniert, sodaß nach 48 Std. die Kontrollen und die mit 6-AN behandelten Tiere gleichviel ausgeschieden haben. Die Hämatokritwerte beider Gruppen unterscheiden sich auch zu diesem Zeitpunkt nicht. (Kontrollen: $50,6 \pm 5,0$; 6-AN : $49,5 \pm 7,5$).

IV. Blutzuckerkonzentration

Über den Verlauf und den Mechanismus der initialen Hyperglykämie nach höheren Dosen 6-AN (50 - 100 mg/kg) liegen genauere Untersuchungen vor. (v. BRUCHHAUSEN 1965; SCHULTZ et al. 1965; v. BRUCHHAUSEN u. HERKEN 1966). Der Gipfel liegt zwischen der 4. und 6. Std. nach der i.p. Injektion. (200 - 240 mg/100 ml).

48 Std. nach der Applikation des Antimetaboliten (10 mg/kg), also zur Zeit des maximalen Glykogengehaltes der Leber, ist auch die Glucosekonzentration im Blut gegenüber den Kontrollen erhöht. (Tab. 2). Diese späte Hyperglykämie scheint nicht, wie die kurz nach der Gabe von 6-AN einsetzende, durch die verstärkte Inkretion von Adrenalin hervorgerufen zu werden, denn schon nach 16 Std. ist das Nebennierenmark an Catecholaminen verarmt. (7 % des Ausgangswertes; SCHACHT 1965). Die Ursache ist eher die hohe Corticosteronkonzentration und die dadurch gesteigerte Gluconeogenese. Nach Epinephrektomie und Hypophysektomie bleibt nämlich der Blutzuckeranstieg ebenso aus, wie die Glykogenspeicherung. (Tab. 2). Außerdem könnte der Wirkungsverlust des Insulins mitbeteiligt sein, der nach 6-AN in vivo und in vitro gefunden wurde und der bei ungestörter Inkretion zu einer Abnahme der "facilitated diffusion" (ROSENBERG 1961) der Glucose führt. (SITT, LOSERT, SCHULTZ, KAESS u. SENFT 1961). Die Hemmung der insulinabhängigen Glucoseaufnahme in die Zelle könnte auch die

Ursache dafür sein, daß bei nebennierenlosen, substituierten Tieren, bei denen der Blutzuckergehalt mit der Dosis ansteigt, zusätzlich gegebenes 6-AN einen additiven Effekt aufweist. (Tab. 3).

DISKUSSION

Folgende Befunde sprechen dafür, daß die Glykogenspeicherung nach 6-AN vorwiegend durch eine vermehrte Abgabe von Corticosteron und über eine dadurch gesteigerte Gluconeogenese zustande kommt:

1. Die Konzentration des Corticosterons im Blutserum ist stark und relativ lange erhöht.
2. Die 6-AN-Wirkung auf den Glykogengehalt der Leber fehlt am nebennieren- und hypophysenlosen Tier.
3. 6-AN kann die Glykogenanreicherung nach Cortisol am epinephrektomierten Tier nicht steigern.
4. Das Glykogen steigt unter 6-AN auch wieder an, wenn es zunächst durch vorausgegangenen 24-stündigen Hunger stark abgesunken war.
5. Die Stickstoffausscheidung ist nach 6-AN größer, das Körpergewicht sinkt stärker ab als bei Kontrolltieren.
6. Die Glucosekonzentration im Blut ist während des maximalen Glykogengehaltes der Leber trotz der fehlenden Kohlehydratzufuhr erhöht.

Schwer zu deuten ist die Tatsache, daß zwischen der höchsten Corticosteronkonzentration im Serum und dem maximalen Glykogengehalt der Leber eine Zeitspanne von 24 - 36 Std. liegt.

Nach neueren Vorstellungen sollen die Glucocorticoide die für die Gluconeogenese wichtigen Enzyme nicht direkt beeinflussen, wie es z. B. von der Galaktose- und Pyruvatoxidase bekannt ist (TOPPER u. PESCH 1958; LEE 1958), sondern deren Synthese im Sinne von Induktoren auslösen. (DEGENHARDT, HÜBENER u. ALESTER 1961; HÜBENER 1960, 1962). Sie hemmen dabei einen Apo-Repressor, der zusammen mit einem Regulatorgen (DNS) die Aktivität eines Operatorgens kontrolliert. Dadurch steigert das Operatorgen die Bildung der spezifischen messenger-RNS einzelner oder mehrerer Strukturgene und löst infolgedessen in den Ribosomen eine verstärkte Synthese der betreffenden Enzymproteine aus. (HÜBENER u. STAIB 1965). Durch diese Vorgänge wird die Latenzzeit erklärt, die

zwischen der Zufuhr bzw. Inkretion und der gluconeogenetischen Wirkung der Nebennierenhormone liegt.

DEGENHARDT et.al. (1961) fanden 1 - 2 Std. nach der Gabe von Cortisol einen Anstieg der Tryptophan-Pyrrolase und der Tyrosin-α-Ketoglutarat-Transaminase mit einem Maximum der Aktivität nach ca. 5 Std. Parallel, aber um 2 Std. verschoben, verläuft die Steigerung der Glykogensynthese. Zur Zeit des höchsten Glykogengehaltes ist das Cortisol vollständig inaktiviert und in der Leber nicht mehr nachweisbar. (HYDE 1957; HÜBENER 1960).

In Anlehnung an diese Experimente würde man 7 - 8 Std. nach der durch 6-AN gesteigerten Inkretion von Corticosteron den höchsten Glykogengehalt in der Leber erwarten. Daß er wesentlich später gefunden wird, könnte durch Interferenz mit anderen 6-AN-Wirkungen und durch die Versuchsanordnung bedingt sein. Das kurz nach Applikation des 6-AN freigesetzte Adrenalin bewirkt über die Reaktionskette: Zunahme des zyklischen 3,5-AMP $\rightarrow$ Steigerung der Glykogenphosphorylase-b-kinase-Aktivität $\rightarrow$ Zunahme der Phosphorylase a (RALL, SUTHERLAND u. BERTHET 1957; SUTHERLAND u. RALL 1960) eine Glykogenolyse mit resultierender Hyperglykämie. Allerdings wird das in der Leber abgebaute Glykogen schnell wieder über den CORI-Zyklus aus dem Glykogen der Muskulatur ersetzt. Zwischenglied dabei ist die Milchsäure im Blut. (CORI 1945). Da das Glykogen außerdem kein nötiger Zwischenschritt bei der Glucosebildung aus kohlehydratfreien Vorstufen ist und der Glucosebedarf während des Hungers relativ groß ist, wird die durch Corticosteron stimulierte Gluconeogenese zunächst nicht als Glykogenanstieg bemerkbar. Andererseits ist bekannt, daß die einmalig induzierten Enzyme tagelang erhalten bleiben können, also auch zu einer Zeit wirksam sind, in der die Konzentration des Induktors (Corticosteron) schon stark abgefallen ist.

Einer der wichtigsten Schritte für die Gluconeogenese ist die Bildung von Phosphoenolpyruvat aus Pyruvat. Das Gleichgewicht der Pyruvatkinase liegt aber stark auf Seiten des Pyruvats, sodaß die einfache Umkehrung

der Reaktion (LARDY u. ZIEGLER 1945) thermodynamisch ungünstig ist und größere Mengen ATP verbraucht. (KREBS 1954). Für die Gluconeogenese werden daher energetisch günstigere Umgehungswege diskutiert, in deren Mittelpunkt das Oxalacetat steht. Es wird durch die Phosphoenolpyruvatcarboxylase und GTP (ITP) wieder zu Phosphoenolpyruvat phosphoryliert und decarboxyliert. (UTTER u. KURAHASHI 1954 a,b; UTTER, KURAHASHI u. ROSE 1954; KREBS 1963). Oxalacetat kann direkt aus Pyruvat unter Fixierung von CO_2 durch die Pyruvatcarboxylase entstehen. (UTTER u. KEECH 1963; KEECH u. UTTER 1963) oder auch über Malat als Zwischenstufe mit Hilfe des "malic enzyme" und der Malatdehydrogenase. Die beiden letzten Enzyme sollen aber durch Cortisol unbeeinflußt bleiben. (MATZELT, ORIOL-BOSCH u. VOIGT 1962; HÜBENER 1960). Dagegen steigt die Aktivität der Pyruvatcarboxylase und der PEP-Carboxylase nach Gabe des Hormons und während des Hungers an. (HENNING, SEIFFERT u. SEUBERT 1963; HENNING, STUMPF, OHLY u. SEUBERT 1966). Aber auch Acetyl-Coenzym-A, dessen Konzentration unter Cortisol ebenfalls zunimmt (WIELAND u. WEISS 1963), kann die Reaktion Pyruvat → Oxalacetat beschleunigen. (UTTER u. KEECH 1960). Es ist noch nicht geklärt, ob der Steigerung der Pyruvatcarboxylase-Aktivität eine direkte induktive Wirkung der NNR-Hormone zu Grunde liegt oder ob sie Folge der veränderten Fließgleichgewichte während der stimulierten Gluconeogenese ist.

Ob diese Reaktionen auch direkt durch 6-AN oder 6-ANAD(P) gestört werden können, ist noch nicht bekannt. Naheliegend wäre die Hemmung rückläufiger Schritte der Gluconeogenese. NEUBERT u. COPER (1964) fanden zwar eine einseitige Hemmung des "malic enzyme" in der Richtung Malat → Pyruvat, während der umgekehrte Schritt unbeeinflußt blieb; möglicherweise ist der Weg Malat Oxalacetat → Phosphoenolpyruvat für die endogene Glucosebildung nach 6-AN bedeutungsvoller. Es werden nämlich nicht nur die Reaktionsgeschwindigkeiten von Oxydoreduktasen durch das 6-AN-Analoge des NAD verringert. COPER u. NEUBERT (1964) konnten dies an der

Phosphorylierung von NAD zu NADHP und v. BRUCHHAUSEN (1964) an der Glykogen-Phosphorylase-Kinase-Reaktion zeigen. Die Hemmung der Phosphorylaseaktivierung kann aber keine ursächliche Bedeutung für den erhöhten Glykogengehalt der Leber haben, denn für die 50 %ige Hemmung waren in vitro 6-ANAD-Konzentrationen von $3 \cdot 10^{-4}$ M erforderlich. Diese werden nach nur 10 mg/kg 6-AN in vivo sicherlich nicht erreicht. Außerdem konnte in vivo auch kein Wirkungsverlust von exogenem und durch 6-AN freigesetztem Adrenalin auf die Blutzuckererhöhung nachgewiesen werden. (SCHULTZ, SENFT, LOSERT u. SCHACHT 1965).

Bisher konnte auch noch nicht geklärt werden, ob 6-AN oder 6-ANAD(P) in der Hypophyse als ACTH-releaser wirkt oder im Hypothalamus den natürlichen CRF freisetzt. Die Gluconeogenese nach 6-AN wird jedenfalls durch elektrisches Verkochen der Kerngebiete im Hypothalmus mit hochfrequenten Wechselströmen nicht eingeschränkt. Auf den hypothalamischen Angriffspunkt des 6-AN weist die tagelang anhaltende Hypothermie hin. Die 6-ANAD(P)-Konzentration ist in diesem Hirngebiet auch höher als im Cortex cerebri und in der Medulla spinalis. Dennoch gibt es für die Toxicität des 6-AN im Zentralnervensystem keine strenge Korrelation zwischen dem Gehalt an 6-AN-Analogen und den histologisch erkennbaren Zellschäden. (SCHNEIDER 1968).

ZUSAMMENFASSUNG

Von den NAD(P)-Analoga des 6-AN war bekannt, daß sie Enzymreaktionen des Kohlenhydratstoffwechsels hemmen können und durch Adrenalinfreisetzung aus dem Nebennierenmark eine vorübergehende Hyperglykämie verursachen.

Es wurde, von diesen Befunden ausgehend, der zeitliche Verlauf des Glykogengehaltes, des Corticosterons im peripheren Blutserum und der Blutzuckerkonzentration verfolgt:

1. 6-AN bewirkt nach einer Latenzzeit von 24 Std. eine Glykogenspeicherung, die trotz fehlender Nahrungszufuhr tagelang anhält. Tiere, die zur Erzeugung eines Kohlehydratmangels schon vor Versuchsbeginn hungerten, reagieren gleichartig.
2. Nach Epinephrektomie bzw. Hypophysektomie bleibt der Anstieg des Glykogens aus, auch nach Substitution mit Cortisol bzw. ACTH.
3. Innerhalb der ersten 6 Std. nach der Injektion von 10 mg/kg 6-AN erreicht die Corticosteronkonzentration im Serum die dreifachen Werte der hungernden Kontrolltiere und bleibt 24 Std. lang erhöht. Am hypophysektomierten Tier fehlt die Corticosteronausschüttung.
4. Die 6-AN-Hyperglykämie ist auch noch zur Zeit des höchsten Leberglykogengehaltes, also 48 Std. nach Gabe des Antimetaboliten, nachweisbar. Durch Epinephrektomie oder Hypophysektomie wird sie verhindert. An Cortisol-substituierten Ratten dagegen ist ein additiver blutzuckererhöhender Effekt nachweisbar.

Diese Befunde sprechen dafür, daß der nach 6-AN beobachteten Glykogenspeicherung keine Abbauhemmung, sondern eine verstärkte Gluconeogenese zu Grunde liegt. 6-AN bewirkt über die Stimulierung des Hypophysen-Nebennierenrinden-Systems eine erhöhte Inkretion von Corticosteron. Die Latenzzeit bis zum Anstieg des Leberglykogens wird durch die Induktion gluconeogenetisch wich-

tiger Enzyme erklärt. Der vermehrte Proteinabbau ist durch die größere Stickstoffausscheidung nach 6-AN belegt. Auch die späte Hyperglykämie läßt sich zwanglos auf die endogene Glucosebildung zurückführen, wobei auch die Hemmung der insulinabhängigen Glucoseaufnahme in die Zelle durch 6-AN mitbeteiligt sein kann.

Noch nicht geklärt ist, ob der primäre Angriffspunkt des 6-AN oder seines NAD(P)-Analogen im Hypothalamus oder in der Hypophyse selbst liegt.

LITERATURVERZEICHNIS

ALTZULER,N.,R. STEELE,J.S. WALL, R.P. DE BODO: Amer. J. Physiol. 191,29 (1957).

- - - - : Amer.J.Physiol. 192,219 (1958); zit. nach HÜBENER, H.J., W.H. STAIB: Biochemie der Nebennierenrinden-Hormone. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1965). S. 109.

v. BRUCHHAUSEN,F.: Hemmung von Phosphokinasen durch das 6-Aminonicotinamid-Analoge (6-ANAD) des Nicotinamid-adenin-Dinucleotids (NAD). Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path.Pharmak. 247,87 (1964).

- : Über die in vitro-Hemmung der Phosphorylase-Aktivierungsreaktion (Phosphorylase-Kinasereaktion) durch 6-Aminonicotinamid-Adenin-Dinucleotid (6-ANAD). Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path.Pharmak. 247,376 (1964).

- : Zum Mechanismus der Hyperglykämie bei der 6-Aminonicotinamidvergiftung der Ratte. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path.Pharmak. 250,241 (1965).

v. BRUCHHAUSEN,F., H. HERKEN: Wirkung des 6-Aminonicotinsäureamids auf die insulinabhängige Glucoseaufnahme in das epididymale Fettgewebe. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmak.u.exp.Path. 254,388 (1966).

BRUNNEMANN,A., H.COPER: Pharmakologische und biochemische Eigenschaften des 6-Aminonicotinamids. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path.Pharmak. 246,63 (1963).

BRUNNEMANN,A., H. COPER, D. NEUBERT: Biosynthese und Wirkung des 6-Aminonicotinamidadenindinucleotids (6-ANAD). Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp. Path.Pharmak. 246,437 (1964).

COPER,H., H. HADASS, H. LISON: Untersuchungen zum Mechanismus zentralnervöser Funktionsstörungen durch 6-Aminonicotinamid. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path.Pharmak. 255,97 (1966).

COPER,H., H. HERKEN: Schädigung des Zentralnervensystems durch Antimetaboliten des Nicotinsäureamids. Dtsch.med.Wschr. 88,2025 (1963), 88,2045 (1963).

COPER,H., D. NEUBERT: Effect of 6-amino NAD and other NAD analogues on the formation of NADHP and its transphosphorylation to ATP. Biochim.biophys. Acta 82,167 (1964).

- - : Einfluß von NADP-Analogen auf die Reaktionsgeschwindigkeit einiger NADP-bedürftiger Oxydoreductasen. Biochim.biophys.Acta 89,23 (1964).

COPER,H., S. KUBICKI, J. VEIT: unveröffentlichte Versuche.

CORI,C.F., G.T. CORI: Glycogen formation in the liver from d- and l-lactic acid. J.biol.Chem. 81,389 (1929).

DEGENHARDT,G., H.J. HÜBENER, I. ALESTER: Über den Wirkungsmechanismus der Glucocorticoide. Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 323,278 (1961).

DIETRICH,L.S., I.M. FRIEDLAND, L.A. KAPLAN: Pyridine nucleotide metabolism. Mechanism of action of the niacin antagonist 6-aminonicotinamide. J.biol.Chem. 237,964 (1958).

DIETRICH,L.S., L.A. KAPLAN, I.M. FRIEDLAND, D.S. MARTIN: Quantitative biochemical differences between tumor and host tissue. VI. 6-Amino-nicotinamide antagonism of DPN-dependent enzymatic systems. Cancer Res. 18,1272 (1958).

DOCUMENTA GEIGY: Wissenschaftliche Tabellen, 6. Auflage (1960).

FOURMAN, P.: J.clin.Invest. 29,1462 (1950). zit. nach DEGENHARDT,G., H.J. HÜBENER, I. ALESTER: Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 323,278 (1961).

GOOD,C.A., H. KRAMER, M. SOMOGYI: The determination of glycogen. J.biol.Chem. 100,485 (1933).

HENNING,H.V., I. SEIFFERT, W. SEUBERT: Cortisol induzierter Anstieg der Pyruvatcarboxylaseaktivität in der Rattenleber. Biochim.biophys.Acta 77,345 (1963).

HENNING,H.V., B. STUMPF, B. OHLY, W. SEUBERT: III. The glucogenic capacity and the activities of pyruvate carboxylase and PEP-carboxylase of rat kidney and rat liver after cortisol treatment and starvation. Biochem.Z. 344,274 (1966).

HERKEN,H., G. SENFT, B. ZEMISCH: Die Einschränkung des tubulären Natrium- und Kaliumtransportes durch Biosynthese 6-Aminonicotinsäureamid enthaltender Nucleotide. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp. Path.Pharmak. 249,54 (1964).

- - - - : Der Einfluß von 6-Aminonicotinsäureamid auf die Verteilung der Natrium- und Kaliumionen zwischen dem extra- und intracellulären Raum in der Leber und der Skeletmuskulatur. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path.Pharmak. 253,364 (1966).

HERKEN,H., V. NEUHOFF: Spektrofluorometrische Bestimmung des Einbaus von 6-Aminonicotinsäureamid in die oxydierten Pyridinnucleotide der Niere. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path.Pharmak. 247,3,187 (1964).

v. HERRATH,D., H. COPER, J. VEIT: On the mechanism of the sleep-prolonging effect of antimetabolites of nicotiamide. Vortrag, gehalten auf dem British and German Pharmacological Societies Meeting in Cambridge. (Sept. 1957).

HUGGET,A.S.G., D.A. NIXON: Use of glucose oxidase, peroxidase and o-dianisidin in determination of blood and urinary glucose. Lancet 273,II 368 (1957).

HUBENER,H.J.: Über den Mechanismus der Gluconeogenese nach oraler Cortisol-Gabe. Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 322,135 (1960).

- : Die physiologische Funktion der Nebennierenrinden-Hormone als Enzyminduktoren. Dtsch. med.Wschr. 87,438 (1962).

HÜBENER,H.J., W.H. STAIB: Biochemie der Nebennierenrinden-Hormone. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1965).

HYDE,P.M.: Liver glycogen deposition after intravenous and intragastric administration of cortisol-4-C^{14} to rats. Endocrinology 61,774 (1957).

ITO,K. : Effects of adrenalectomy on liver gluconeogenesis. Japan J.exp.Med. 32,6 615 (1962).

JOHNSON,W.J., J.D. McCOLL: 6-Aminonicotinamide- a potent nicotinamide antagonist. Science 122,834 (1955).

- - : Antimetabolite activity of 6-aminonicotinamide. Fed.Proc. 15,284 (1956).

KEECH,D.B., M.F. UTTER: Pyruvate carboxylase. J.biol. Chem. 238,2609 (1963).

KENDALL,E.C.: The influence of the adrenal cortex on the metabolism of water and electrolytes. Vitam. and Horm. 6,277 (1948).

KJELDAHL,J.: Z.analyt.Chem. 22,366 (1883).

KREBS,H.A.: Considerations concerning the pathways of synthesis in living matter. Bull. Johns Hopkins Hosp. 95,19 (1954).

- : Gluconeogenesis. Proc.Royal Soc. B. 159,545 (1964).

LARDY,H.A., J.A. ZIEGLER: The enzymatic synthesis of phosphopyruvate from pyruvate. J.biol.Chem. 159,343 (1945).

LEE,L.E. : Effect of steroid hormønes on rat liver pyruvic oxidase. Fed.Proc. 17,262 (1958).

LONG,C.N.H., E.G. FRY, M. BONNCASTLE: 1st Int.Congr. Endocrinology, Copenhagen (1960). S. 819 zit. nach DEGENHARDT,G., H.J. HÜBENER, I. ALESTER: Hoppe-Seyler's Z. physiol.Chem. 323,278 (1961).

LONG,C.N.H., B. KATZIN, E.G. FRY: Endocrinology 26,309 (1940).

MATZELT,D., A. ORIOL-BOSCH, K.D. VOIGT: Der Einfluß von Cortisol auf transminierende und glykolytische Enzymaktivitäten der Rattenleber. Biochem.Z. 335,485 (1962).

MIGEON,C.L., A.A. SANDBERG, K.A. DECKER, D.F. SMITH, A.C. PAUL, L.T. SAMUELS: Metabolism of 4-C^{14}-cortisol in man: body distribution and rates of conjugation. J.clin.Endocrinol. and Metab. 16,1137 (1956).

NELSON,N.: A photometric adaptation of the SOMOGYI method for the determination of glucose. J.biol.Chem. 153,375 (1944).

NEUBERT,D., H. COPER: Die Geschwindigkeit der "malic enzyme"-Reaktion in Gegenwart von NADP-Analoga. Biochem.Z. 341,485 (1965).

PARNAS,J.K., R. WAGNER: Z.analyt.Chem. 114,261 (1938).

PETERSON,R.E.: The identification of corticosterone in human plasma and its assay by isotope dilution. J.biol.Chem. 225,25 (1957).

PETERSON,R.E., CH.E. PIERCE: The metabolism of corticosterone in man. J.clin.Invest. 39,741 (1960).

RALL,T.W., E.W. SUTHERLAND, J. BERTHET: Effects of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenates. J.biol.Chem. 224,463 (1957).

REDETZKI,H.M., F. ALVAREZ-O'BOURKE: 6-Aminonicotinamide, a central nervous system depressant. J.Pharmacol. exp.Ther. 137,2 173 (1962).

RETIENE,K., M. FISCHER, H. DITSCHUNEIT, E.F. PFEIFFER: zit. nach H. NOWAKOWSKI: Aldosteron, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1963), S. 95.

ROSENBERG,T.: Path.et Biol. 9,795 (1961). zit. nach WILBRANDT,W.: Probleme des aktiven Transportes (Transportmechanismus und Pharmakologie). Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path.Pharmak. 245,28 (1963).

SCHACHT,U.: Der Einfluß von 6-Aminonicotinamid auf den Catecholamin- und ATP-Gehalt der Nebennieren. Inaug.-Diss., Med.Fak.d.Freien Universität Berlin (1965).

SCHACHT,U., G. SCHULTZ, G. SENFT: Störungen im Catecholaminstoffwechsel der Nebennieren nach Applikation von 6-Aminonicotinsäureamid. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path.Pharmak. 250,281 (1965).

SCHNEIDER,H.: Morphologische Befunde am Zentralnervensystem der Ratte nach Nicotinamidanalogen (6-Aminonicotinamid und 3-Acetylpyridin) und

einem Chinolinderivat (5-Nitro-8-hydroxychinolin). In Vorbereitung (1968).

SCHULTZ,G., G. SENFT, W. LOSERT, U. SCHACHT: Zum Mechanismus der 6-Aminonicotinsäureamid-Hyperglykämie. Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path. Pharmak. 253,345 (1966).

SILBER,R.H., C.C. PORTER: The determination of 17,21-dihydroxy-20-ketosteroids in urine and plasma. J.biol.Chem. 210,923 (1954).

SITT,R., W. LOSERT, G. SCHULTZ, H. KAESS, G. SENFT: Der Einfluß von Insulin auf den Kaliumtransport in der Skeletmuskulatur. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak.u.exp.Path. 255,398 (1966).

SMITH,P.E.: Hypophysectomy and replacement therapy in the rat. Amer.Jour.Anat. 45,205 (1930).

SOMOGYI,M.: A new reagent for the determination of sugars. J.biol.Chem. 160,61 (1945).

- : Notes on sugar determination. J.biol.Chem. 195,19 (1952).

STERNBERG,S.S., F.S. PHILIPS: 6-Aminonicotinamide and acute degenerative changes in the central nervous system. Science 127,644 (1958).

- - : Biological effects of 6-aminonicotinamide. Bull. N.Y.Acad.Med. 35,811 (1959).

SUTHERLAND,E.W., T.W. RALL: The relation of adenosine-3',5'-phosphate and phosphorylase to the actions of catecholamines and other hormones. Pharmacol. Rev. 12,265 (1960).

SWEAT,M.L.: Sulfuric acid-induced fluorescence of corticosteroids. Anal.Chem. 26,I 773 (1954).

SYNDOR,K.L., G. SAYERS: Blood and pituitary ACTH in intact and adrenalectomized rats after stress. Endocrinology 55,621 (1954).

TOPPER,Y.J., L.A. FESCH: Galactose: its in vitro oxidation as influenced by steroids. Fed.Proc. 17,323 (1958).

UTTER,M.F., D.B. KEECH: Formation of oxalacetate from pyruvate and CO_2. J.biol.Chem. 235,PC 17 (1960).

UTTER,M.F., D.B. KEECH: Pyruvate carboxylase. J.biol. Chem. 238,2603 (1963).

UTTER,M.F., K. KURAHASHI: Purification of oxalacetic carboxylase from chicken liver. J.biol.Chem. 207,787 (1954 a).

- - : Mechanism of action of oxalacetic carboxylase. J.biol.Chem. 207,821 (1954 b).

- - ; I.A. ROSE: Some properties of oxalacetic carboxylase. J.biol.Chem. 207,803 (1954).

WELT,I.D., DE WITT,S. Jr., D.J. INGLE, E.H. MORLEY: Effect of cortisone of glucose production and oxidation in the rat. J.biol.Chem. 197,57 (1952).

WIELAND,O., L. WEISS: Biochem.Biophys.Res.Comm. 10,493 (1963).

WOLF,A., D. COWEN: Pathological changes in the central nervous system produced by 6-aminonicotinamide. Bull.N.Y.Acad.Med. 35,814 (1959).

ZEMISCH,B.: Störungen des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes nach Bildung abnorm strukturierter NAD- bzw. NADP-Analoga. Inaug.-Diss., Med.Fak. d.Freien Universität Berlin. (1964).

ZENKER,N., D.E. BERNSTEIN: The estimation of small amounts of corticosterone in rat plasma. J.biol.Chem. 231,695 (1958).

Herrn Professor Dr. med. H. Herken danke ich für die wertvollen Anregungen, sein stetes Interesse und die Förderung, die die Anfertigung dieser Arbeit im Pharmakologischen Institut ermoglichten.

Herrn Professor Dr. med. H. Coper gilt mein Dank für die vielen Ratschläge bei der Ausführung der Versuche, seine Umsicht und ständige Bereitschaft zur Diskussion der Schwierigkeiten, die sich theoretisch und praktisch ergaben.

LEBENSLAUF

Am 10. 3. 1940 wurde ich als zweiter Sohn des Anatomen Professor Dr. med. Ernst von Herrath und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Schneider in Fribourg/Schweiz geboren.

Drei Jahre nach unserer Übersiedlung nach Gießen im Jahre 1941 wurden wir ausgebombt und nach Rodheim-Bieber, einem Vorort Giessens, evakuiert. Dort besuchte ich von 1946 bis 1951 die Volksschule und danach 9 Jahre lang das altsprachliche Landgraf-Ludwigs-Gymnasium in Gießen, wo ich 1960 die Reifeprüfung bestand.

Als Vorzeitig-Dienender leistete ich nach dem Abitur den 12-monatigen Wehrdienst bei der 3./Feld-Art.-Btl. 55 und schied als Fahnenjunker der Reserve aus.

Von 1961 bis 1966 studierte ich Medizin in Berlin und München. An der Freien Universität Berlin legte ich die naturwissenschaftliche und ärztliche Vorprüfung und am 15. 2. 1967 das medizinische Staatsexamen ab.

Mit der vorliegenden Dissertation begann ich während des klinischen Studiums und setzte sie seit dem 1. 4. 1967 als Medizinalassistent am Pharmakologischen Institut der Freien Universität fort.